

Donor specific transfusion および FK506 投与による マウス皮膚移植片生着延長効果の検討

馬 場 俊 雄

札幌医科大学医学部外科学第2講座 (主任 小松作蔵 教授)

村 上 正 晃

北海道大学免疫科学研究所免疫病態部門 (主任 上出利光 教授)

Experimental studies on prolongation of mouse skin allografts by FK506 plus donor specific transfusion

Toshio BABA

*Second department of Surgery, Sapporo Medical University, School of Medicine
(Chief : Prof. S. KOMATSU)*

Masaaki MURAKAMI

*Section of Immunopathogenesis, Institute of Immunological Science, Hokkaido University
(Chief : Prof. T. UEDE)*

ABSTRACT The beneficial effect of pretreatment with donor specific transfusion (DST), with or without concurrent immunosuppression by the recipient, on the subsequent survival of allografts has been reported in animals as well as clinical studies. Studies to analyze factors influencing the anti-alloimmune response have suggested that presentation of alloantigen-bearing cells via the intravenous (i. v.) route produces different outcomes depending on the disparity of the donor-host combination as well as the physiologic state of recipients and the cell components of blood used for alloantigen-sensitization. In order to analyze what cell component used for the i.v. alloantigen-sensitization induces more efficient prolongation of skin graft survival, we prepared four different cells derived from BALB/c mice: (i) untreated fetal liver-derived cells, (ii) GM-CSF cultured fetal liver-derived cells, (iii) untreated adult spleen cells, and (iv) GM-CSF cultured adult spleen cells. C3H/He mice were i. v. presensitized with class I and II disparate versions of these four cells in the presence or absence of suboptimal doses of FK506 treatment (1.0 mg/kg/day, for 11 days). The survival of BALB/c skin grafts was prolonged when they were implanted into C3H/He mice which had been presensitized with untreated or GM-CSF cultured fetal liver-derived cells (26.1 or 26.7 days, respectively) in the presence of FK506. This effect disappeared when subjects were treated with uncultured or GM-CSF cultured adult spleen cells (13.7 or 18.2 days, respectively). FACS analysis was performed with GM-CSF treated fetal liver and adult spleen cells. GM-CSF cultured adult spleen cells expressed significant levels of class I, II, and CTLA4-ligand molecules. In contrast, GM-CSF cultured fetal liver-derived cells expressed very few class I, II, and CTLA4-ligand molecules. Morphological analysis demonstrated that in GM-CSF cultured fetal liver-derived cells, there were neutrophils, macrophage-like cells, and dendritic cells. On the other hand in GM-CSF cultured adult spleen cells, only macrophage-like cells and dendritic cells were observed. In conclusion, presensitization with fetal liver-derived cells induced suppression of anti-alloimmune responses efficiently in the presence of FK506. Because GM-CSF cultured fetal liver-derived cells expressed very few class I,

II, and CTLA4-ligand molecules, it seems reasonable to speculate that these fetal liver-derived cells were hardly recognized or attacked by allo-reactive T cells and might induce partial anergy state in recipients treated with suboptimal doses of FK506.

(Received December 27, 1995 and accepted February 8, 1996)

Key words: DST, GM-CSF, Fetal liver cell, FK506, Skin graft

1 結 言

臓器移植において、レシピエントにあらかじめドナーの血液もしくはその細胞の一部を投与するドナー特異的輸血 (donor specific transfusion: DST) は、その後に移植された臓器の生着延長をもたらすことが知られている¹⁻⁴⁾。しかし、生着延長の機序や、どのような細胞が最も効率よく生着延長をもたらすかなど解析すべき課題は多い。今回、著者らは major histocompatibility complex (MHC) class I, II がともに異なる組み合わせ (BALB/c マウスから C3H/He マウスに移植を行う) において皮膚移植を施行し、DST と FK506 の併用効果を比較検討した。さらに細胞による DST 効果の差を解析するため、DST する細胞を BALB/c マウスの胎児肝臓由来細胞あるいは成体脾臓細胞そのものか、これらの細胞を mouse granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) 存在下に培養したものを用い、それぞれの効果について比較検討を試みた。

2 実験と方法

2.1 実験動物

マウスは日本エス・エル・シー社 (静岡) にて specific pathogen free の条件下に飼育された純系 C3H/He 雌 7 週齢, BALB/c 雄 7 週齢, BALB/c 胎児 (妊娠 14-19 日) を用いた。

2.2 実験方法

2.2.1 薬剤および投与方法

FK506 (藤沢薬品株式会社提供) 1.0 mg/kg/day を DST を施行した日から 11 日間連続皮下注にて投与した。

2.2.2 細胞培養方法

BALB/c 胎児肝臓または成体 (7 週齢) 雄の脾臓をそれぞれ採取し、ホモゲナイザーにて細胞懸濁液を作成後、メッシュフィルターでろ過し、赤血球を NH_4Cl にて除去した。細胞を RPMI-1640 (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) で 2 回洗浄後、細胞培養液 (10% fetal calf serum, 2-mercaptoethanol 5×10^{-2}

M/500 μl , 100 ng/ml の mouse GM-CSF を含む RPMI-1640) でそれぞれ 5×10^4 個/ml の濃度に調節し、37°C, CO_2 5.0% の条件下に 10 日間培養した。その間 2 日おきに 30% づつ新しい細胞培養液と交換した。

2.2.3 DST の種類と投与法

BALB/c マウスの胎児肝臓由来細胞 (Dir-Fetal-Liv) および成体脾臓細胞 (Dir-Adult-Spl) そのものか、あるいはこれらの細胞を GM-CSF 存在下に 10 日間培養したもの (GM-Fetal-Liv および GM-Adult-Spl) をそれぞれ 5×10^6 個づつ、C3H/He の尾静脈へ投与した。DST は各々のマウスに対し、1 回のみ施行した。

2.2.4 皮膚移植法

BALB/c マウス雄 7 週齢の尾より皮膚全層を採取し、 $8 \times 8 \text{ mm}^2$ に整え、C3H/He マウス雌 7 週齢の右胸背部に皮膚移植した⁵⁾。移植後 7 日目に包帯をはずし、全ての皮膚移植片とも拒絶されていないことを確認した。この日より連日観察し、移植片の壊死部を定規にて測定し、その面積を算出し移植片の約 80% 以上が壊死化した時点を拒絶とした。皮膚移植は FK506 あるいは DST 処置後 7 日目に行った (Fig. 1)。

2.2.5 フローサイトメーターによる細胞表面抗原の解析

GM-Fetal-Liv および GM-Adult-Spl をそれぞれ 5×10^5 個採取し、抗マウス Fc γ 受容体抗体にて前処理を行った後、1 次抗体 (3 $\mu\text{g/ml}$)、2 次抗体 (3 $\mu\text{g/ml}$) を氷上でそれぞれ 1 時間ずつ反応させた。抗体の詳細は Table 1 に示した。Propidium Iodide (Sigma Chemical Co. Ltd) にて染色し、生細胞を分画後、FACScan flow cytometer (Becton Dickinson) にて解析した。

2.2.6 細胞形態の検討

GM-Fetal-Liv および GM-Adult-Spl を GM-CSF 培養 7 日目に Lab-Tek Chamber Slide (Nunc Inc.) 上に移してさらに 2 日間培養し、Diff-Quick (鑑別用血液染色液: 国際試薬株式会社) を使用し、染色した。

2.3 実験群の分類

実験モデルを I 群: 無処置群 ($n=5$), II 群: FK506

Table 1 Monoclonal antibodies used in this study

Specificities	Species/isotype	Clone	Label
Fcγ-Receptor II and III	Rat/IgG2b	2.4G2	—
MHC class I (H2D ^d)	C3H/IgG2a	34-2-12	PE
MHC class II (IA [*])	SJL/IgG2b	AMS-32.1	FITC
Thy 1.2	Rat/IgG2b	30-H12	FITC
MAC 1	Rat/IgG2b	M1/70.15.11.5HL	FITC
CD3	Rat/IgG2b	YCD3-1	FITC
c-kit	Rat/IgG2b	ACK2	FITC
ICAM-1	Rat/IgG1	IA29	FITC
CD44	Rat/IgG2b	IM7	FITC
B220	Rat/IgM	RA3-3A1/6.1	FITC
NLDC 145 defined antigen	Rat/IgG2a	NLDC145	FITC
B7-1	Rat/IgG2a	1G10	FITC
B7-2	Rat/IgG2a	GL1	PE
CTLA-4	Mause-human [*]	—	PE

^{*} Extracellular portion of mouse CTLA4 was fused to Fc portion of human immunoglobulin.

投与群 (n=6), Table 2-III 群: GM-Adult-Spl DST 群 (n=4), Table 2-IV 群: GM-Adult-Spl DST+FK506 投与群 (n=5), Table 2-V 群: GM-Fetal-Liv DST 群 (n=5), Table 2-VI 群: GM-Fetal-Liv DST+FK506 投与群 (n=10), および Table 3-III 群: Dir-Adult-Spl DST 群 (n=3), Table 3-IV 群: Dir-Adult-Spl DST+FK506 投与群 (n=3), Table 3-V 群: Dir-Fetal-Liv DST 群 (n=7), Table 3-VI 群: Dir-Fetal-Liv DST+FK506 投与群 (n=11) の 10 群に分類した。

2.4 統計処理

皮膚移植片の生着期間の解析から生着期間 (日数) の平均±標準偏差で表し, 統計学的検定には分散分析を用い, 有意差がある場合, 群間の比較には Fisher の PLSD 法を用いた。危険率 5%以下を有意差ありと判定した。

3 結 果

3.1 GM-CSF 培養細胞 DST による皮膚移植片生着期間 (Table 2, Fig. 2).

BALB/c から C3H への皮膚移植片の生着期間は, I 群 8.4 ± 1.1 日, II 群 14.8 ± 1.7 日であった。Table 2-III 群では 13.3 ± 1.5 日, Table 2-V 群は 13.4 ± 2.3 日, Table 2-IV 群では 18.2 ± 1.9 日, Table 2-VI 群では 26.7 ± 8.1 日であった。すべての処置群 (II, Table 2-III から VI 群) は I 群と比較して生着延長が認められた。また, Table 2-VI 群は I 群, II 群, Table 2-III

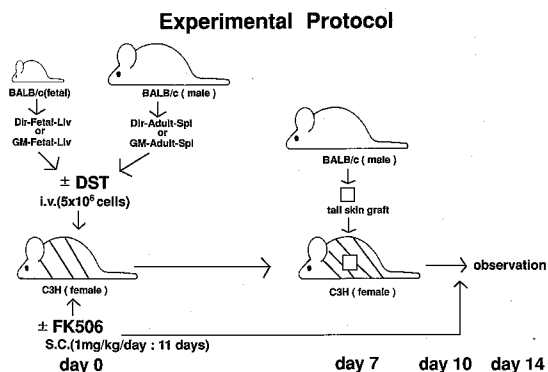


Fig. 1 C3H recipient mice were treated with either DST, FK506 or the combination of the two on day 0. On day 7 tail skins of BALB/c donor mice were grafted into C3H recipient mice. FK506 was injected once a day to C3H recipient mice from day 0 to day 10. Grafted tail skin was scored daily.

群に対して危険率 0.1%以下の有意差で, Table 2-IV 群に対しては危険率 5%以下の有意差で移植片の生着延長がみられた (Table 2, Fig. 2).

3.2 採取細胞をそのまま DST したときの皮膚移植片生着期間 (Table 3, Fig. 3)

成体脾臓細胞あるいは胎児肝臓由来細胞を培養することなく, そのまま DST した群の皮膚移植片の生着期間は, Table 3-III 群では 13.7 ± 0.6 日, Table 3-V 群では 10.4 ± 0.8 日であった。Table 3-IV 群は $16.7 \pm$

Table 2 Prolongation of skin allograft survival by FK506 plus DST^{a)}

Group	Treatment	survival time (days)	Mean Survival time (days)	P vs I	P vs II	P vs III	P vs IV	P vs V
I	No treatment	7, 8, 8, 9, 10	8.4±1.1					
II	FK506	12, 14, 15, 15, 16, 17	14.8±1.7	<0.05				
III	GM-Adult-Spl DST	11, 14, 14, 14	13.3±1.5	NS ^{b)}	NS			
IV	GM-Adult-Spl DST+FK506	16, 17, 18, 19, 21	18.2±1.9	<0.05	NS	NS		
V	GM-Fetal-Liv DST	11, 11, 14, 15, 16	13.4±2.3	NS	NS	NS	NS	
VI	GM-Fetal-Liv DST+FK506	18, 19, 22, 22, 22, 26, 28, 32, 34, 44	26.7±8.1	<0.001	<0.001	<0.001	<0.05	<0.001

^{a)} Recipient C3H female mice received zero or subtherapeutic doses (1.0 mg/kg/day) of FK506 subcutaneously daily for 11 days and GM-Fetal-Liv (5×10^6 cells) or GM-Adult-Spl (5×10^6 cells) were intravenously injected to C3H mice.

Tail skin obtained from BALB/c male mice was grafted into the back of C3H female mice at day 7 post-DST treatment.

^{b)} NS; not significant

Table 3 Prolongation of skin allograft survival by FK506 plus DST^{a)}

Group	Treatment	Survival time (days)	Mean Survival time (days)	P vs I	P vs II	P vs III	P vs IV	P vs V
I	No treatment	7, 8, 8, 9, 10	8.4±1.1					
II	FK506	12, 14, 15, 15, 16, 17	14.8±1.7	<0.05				
III	Dir-Adult-Spl DST	13, 14, 14	13.7±0.6	NS ^{b)}	NS			
IV	Dir-Adult-Spl DST+FK506	11, 19, 20	16.7±4.9	<0.05	NS	NS		
V	Dir-Fetal-Liv DST	10, 10, 10, 10, 10	10.4±0.8	NS	0.044	NS	0.0228	
VI	Dir-Fetal-Liv DST+FK506	13, 20, 23, 25, 25, 27, 29, 31, 31, 31, 32	26.1±5.8	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

^{a)} Recipient C3H female mice received zero or subtherapeutic doses (1.0 mg/kg/day) of FK506 subcutaneously daily for 11 days and Dir-Fetal-Liv (5×10^6 cells) or Dir-Adult-Spl (5×10^6 cells) were intravenously injected to C3H mice.

Tail skin obtained from BALB/c male mice was grafted into the back of C3H female mice at day 7 post-DST treatment.

^{b)} NS; not significant

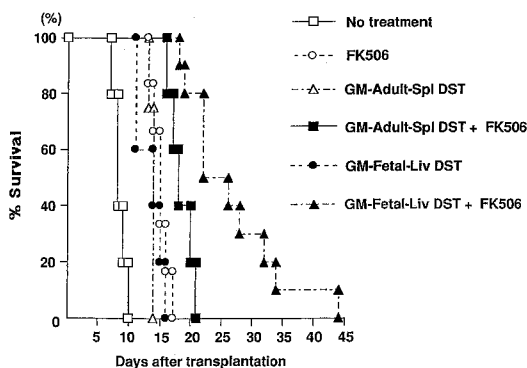


Fig. 2 Recipient C3H female mice were treated with either DST, FK506 or the combination of the two. Spleen cells (GM-Adult-Spl) or fetal liver cells (GM-Fetal-Liv) of BALB/c mice cultured in the presence of GM-CSF for 10 days were used as sources of DST. Timing of DST, skin graft, and FK506 injection are shown in Fig. 1.

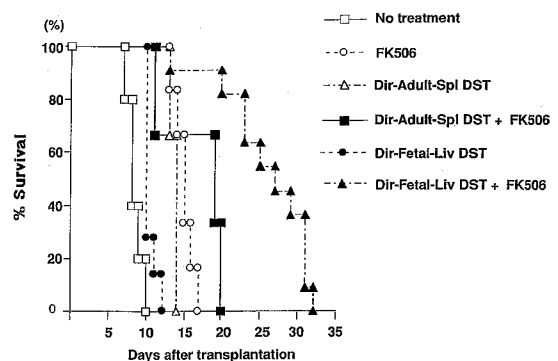


Fig. 3 Recipient C3H female mice were treated with either DST, FK506 or the combination of the two. Spleen cells (Dir-Adult-Spl) or fetal liver cells (Dir-Adult-Liv) of BALB/c mice were used as sources of DST. Timing of DST, skin graft, and FK506 injection are shown in Fig. 1.

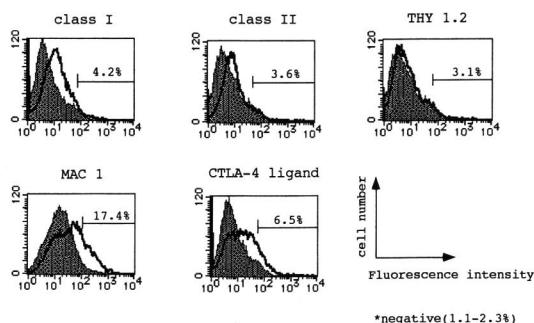


Fig. 4 Flow cytometric analysis of MHC class I, class II, THY 1.2, MAC1, and CTLA4-ligand expression on GM-CSF cultured BALB/c fetal liver cells. Shadow histograms indicate background. Solid lines indicate fluorescence intensity of stained antibodies.

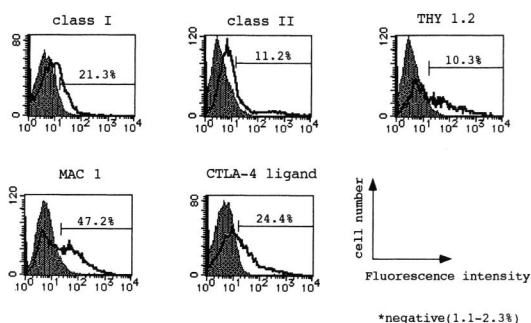


Fig. 5 Flow cytometric analysis of MHC class I, class II, THY 1.2, MAC1, and CTLA4-ligand expression on GM-CSF cultured BALB/c adult spleen cells. Shadow histograms indicate background. Solid lines indicate fluorescence intensity of stained antibodies.

4.9 日, Table 3-VI 群では 26.1 ± 5.8 日と移植片の生着延長をみた. すべての処置群 (Table 3-II から VI 群) は I 群に比較して生着延長認めた. Table 3-VI 群は Table 3-IV 群に比較して 0.1% 以下の危険率で有意に生着延長した (Table 3, Fig. 3).

3・3 培養細胞と採取細胞による DST 効果の比較

Table 2-VI 群と Table 3-VI 群との間には有意差は認められなかった. しかし, Table 2-VI 群および Table 3-VI 群は Table 2-IV 群および Table 3-IV 群に比較して有意に生着延長が認められた.

3・4 GM-CSF 培養細胞の表面抗原の解析

GM-Fetal-Liv は class II (3.6%), THY 1.2 (3.1%) の発現がほとんど認められず, class I (4.2%), MAC 1 (17.4%), CTLA-4 ligand (6.5%) の弱い発現が認められた (Fig. 4). これに対して GM-Adult-Spl は class I (21.3%), class II (11.2%), THY

1.2 (10.3%), CTLA-4 ligand (24.4%), MAC 1 (47.2%) の発現が認められた (Fig. 5). 両細胞の発現分子を比較すると GM-Fetal-Liv では GM-Adult-Spl と比較して class I, II, THY 1.2, CTLA-4 ligand の発現が低いことが判明した.

3・5 培養細胞の形態

GM-Fetal-Liv は好中球やマクロファージ様細胞が主体で樹枝状様細胞も散見された (Fig. 6). 一方, GM-Adult-Spl はマクロファージ様細胞と樹枝状様細胞が主体であった (Fig. 7).

4 考 察

臓器移植に際しみられる免疫反応をいかに抑制するかは移植外科における大きな命題である. 臓器移植に際し, レシピエントの T 細胞は移植片中のアロ MHC 分子などを直接認識し, T 細胞の活性化が起こる. こ

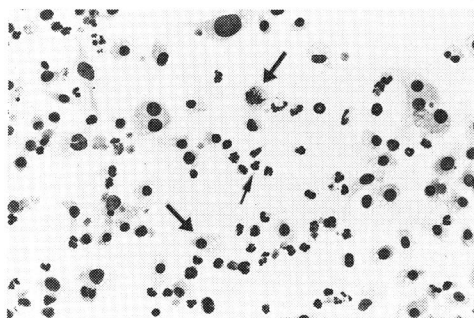
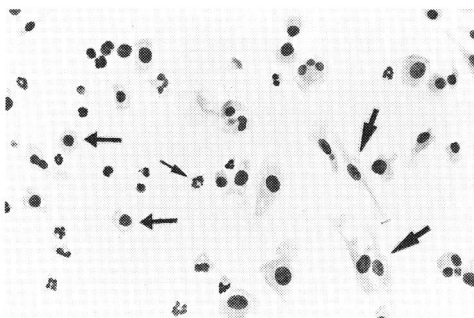


Fig. 6 GM-CSF cultured BALB/c fetal liver cells. There are macrophage-like cells (→), dendritic cells (→) and neutrophils (→). $\times 340$

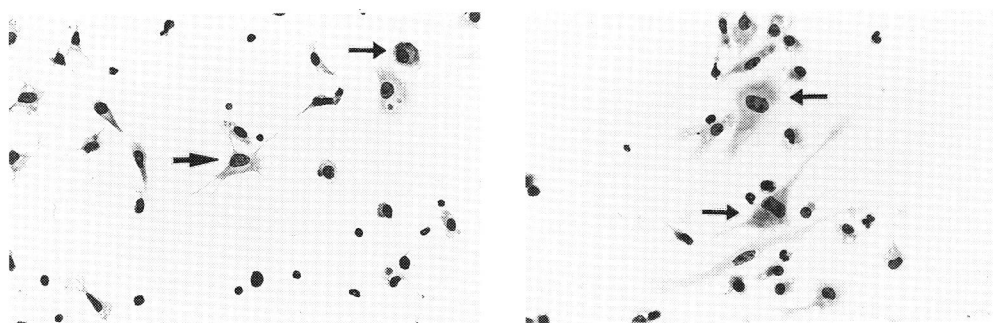


Fig. 7 GM-CSF cultured BALB/c adult spleen cells. There are macrophage-like cells (→) and dendritic cells (→). ×340

のときT細胞の活性化にはT細胞受容体を介した移植抗原特異的な信号と抗原非特異的な補助信号 (costimulatory signal) の2つの異なる信号が必須である。T細胞上の補助信号の受容体にはCD28やCTLA4分子があり、これに対応するligandは抗原提示細胞あるいは移植片上のB7-1やB7-2分子である。著者らの教室ではこのcostimulatory signalを可溶性IgM型CTLA4分子によって阻害することでT細胞の活性化ひいては拒絶反応を抑制することをすでに報告している⁶⁾。

現在、アロ反応性T細胞の活性化抑制にはcyclosporineやFK506等の免疫抑制剤が使用され効果を上げている。今回著者が用いたFK506はT細胞内でFK binding proteinと結合し、この複合体が抗原刺激伝達に必要なカルシウム・カリモジュリン依存性脱リン酸化酵素であるカルシニューリンの活性を阻害する。その結果、T細胞受容体から核への信号が遮断され、T細胞の増殖、IL-2等のサイトカインの産生が抑制される^{7,8)}。副作用としては易感染性、腎毒性があげられている^{9,10)}。

一方、DSTの概念は、臨床において移植前輸血を受けた腎移植患者の移植腎生着率が輸血を受けなかった腎移植患者に比較し有意に高かったことから派生している¹¹⁾。動物実験や臨床において血液のみでなくドナーの骨髄などの組織細胞をレシピエントに移入し前感作させることによりその後の臓器移植において生着の延長がみられるとの報告もある¹⁻⁴⁾。Table 4にこれまでのDSTの成績について主たるものをまとめてみた。IwataらはMHC class IおよびMHC class I, IIの異なる組み合わせのマウス皮膚移植の系でドナーの脾臓細胞のDSTと低濃度のFK506を併用することで皮膚移植片の生着延長を得た。彼等はそのメカニズムとしてDSTにより細胞傷害性を持つCD8⁺T細胞を機能

不全にし、FK506によりDST抵抗性のCD4⁺T細胞を抑制すると報告している¹²⁾。HaradaらはMHC class Iの異なる組み合わせでcyclophosphamide投与の有無の条件下に、静止期のB細胞およびlipopolysaccharideで活性化したB細胞をそれぞれ単独あるいは両者ともにDSTした系で皮膚移植片の生着期間を解析した。静止期および活性化B細胞とともにDSTした群はそれぞれ単独にDSTした群と比較して有意な生着延長が認められた。彼等は生着延長のメカニズムとして静止期および活性化B細胞上のcostimulatory signalを導入できる分子を想定している¹³⁾。Gorzynskiらはマイナー抗原不一致のマウスの組み合わせで皮膚移植を施行した。門脈を介した脾細胞のDSTとnitric oxide synthesis合成阻害剤の併用により移植片の生着延長が認められた。その際、腹腔リンパ節細胞でIL-4およびIL-10の産生が増加し、IL-2およびINF γ の産生が減少していることが示された。つまりヘルパーT細胞がTh2型に傾いていることを報告している¹⁴⁾。LinらはMHC class I, IIがともに異なるラット心移植において移植14日前あるいは当日にDSTおよびCTLA4-Ig投与を併用しても移植片の生着延長にほとんど影響しないが、移植当日にDSTを施行し、その2日後にCTLA4-Ig投与を行うと長期生着を得たと報告している。彼等は移植片から出るpassenger leucocyteに対するレシピエントの免疫反応が移植後2日でピークを迎えるというLarsenらの報告¹⁸⁾を引用し、2日目のCTLA4-Ig投与の重要性を考察しているが、DSTの相乗効果のメカニズムについては考察されていない¹⁵⁾。Fujiwaraらのグループはclass IのみあるいはIIのみ異なるマウスの組み合わせにおいて皮膚移植を施行し、class Iのみ異なるマウスの組み合わせでは無処置の脾細胞のDSTでさえ皮膚移植片の生着を有意に延長できた。一方、

Table 4 Summary of Donor Specific Transfusion

reference NO.	DST	graft	species	Donor	Recipient	Immunosuppression	Survival	others
12	Spleen cells	Skin	mouse	B10. QBR	B6	FK506	>40	MHC class I disparate
	Spleen cells	Skin	mouse	C3H	B6	FK506	>30	MHC class I & II disparate
13	Activated B cells*+Spleen cells	Skin	mouse	B10. A	B10. BR	cyclophosphamide	>60	MHC class I disparate
14	Irradiated Spleen cells	Skin	mouse	B10. BR	C3H/HeJ	NO ^{g)}	>20	DST via Porral vein
15	Splenocytes	Heart	rat	Lewis	Brown Norway	CTLA4-Ig	>100	MHC class I & II disparate
16	Irradiated Spleen cells	Skin	mouse	B6(bm1) ^{g)}	B6	CsA	>70	MHC class I disparate
17	Spleen cells+Sephadex G-10 ^{h)}	Skin	mouse	B6(bm12) ^{g)}	B6		>40	MHC class II disparate

^{a)} To prepare the activated B cells, the spleen cells from naive mice were cultured with LPS and enriched by Percoll gradient.

^{b)} Sephadex G-10 column passed spleen cells

^{g)} Class I H-2-disparate B6-C-H-2^{bm1}

^{g)} Class II H-2-disparate B6-C-H-2^{bm12}

^{g)} inhibitor of nitric oxide synthesis

class II のみ異なるマウスの組み合わせでは無処置の脾細胞の DST では効果がなかったが、抗原提示細胞を除いたドナーの脾細胞を DST したところ皮膚移植片の有意な生着延長が認められた。これらの結果から彼等は、CD4⁺・T 細胞と CD8⁺・T 細胞の両者への免疫寛容導入が皮膚移植片の生着延長に重要なこと、これらの細胞間で免疫寛容導入のメカニズムが異なるであろうことを考察している^{16,17)}。一方、DST のためにかえって感作されてしまい拒絶を強める結果となった例も報告されている¹⁹⁻²⁰⁾。以上のような背景を踏まえ、DST による移植片の生着延長は明らかに FK506 とは異なるメカニズムによってもたらされている。しかも DST では多くの場合、脾細胞が用いられてきたが、どのような細胞がより効率良く移植片の延長をもたらすのか解析すべき課題は多い。

今回、著者らは拒絶反応が強く惹起される class I および class II の異なるマウスの組み合わせの皮膚移植を施行した。DST する細胞としては胎児の肝臓由来細胞をそのまま用いた場合と GM-CSF で培養したものを使用した。コントロールとして成体の脾臓細胞そのものと GM-CSF 存在下に培養したものも用いた。また、単独では治療効果のない、しかも副作用の出ない少量の FK506 を併用した。今回著者らが胎児の肝臓由来の細胞に注目した理由は第 1 に、一般に移植に際し強い拒絶反応が起こる皮膚移植片でさえも新生児由来の皮膚では抗原性が低く、アロ皮膚移植において拒絶されにくいという報告があること²³⁾。第 2 に、一般に肝移植が他の臓器移植よりも生着しやすいので肝臓中に移植時にトランスを引き起こす細胞が存在する²⁴⁾との考えからである。

肝由来の細胞を DST に用いる研究は Starzl らによりすでに行われている。つまり、成体マウス肝臓由来の細胞を GM-CSF にて 10 日間培養すると class II 陰性、NLDC145 陽性、ICAM-1 陽性、CTLA-4 counter-receptors 陰性 (B7-1 および B7-2) の未熟な樹枝状細胞を得ることができる。T 細胞の活性化に重要な class II および CTLA-4 counter-receptors の発現が認められないことはこの細胞がレシピエントの免疫系から逃れるために好都合であることが予想された。事実、この細胞を DST するとレシピエントの脾臓やリンパ節等の T 細胞依存域に生着する。この結果から、彼等は GM-CSF で増殖する肝臓に存在する未熟な樹枝状細胞がレシピエントの体内で増殖し、マイクロキメリズムを引きおこし、免疫寛容を誘導することができるのではないかと考察している²⁵⁻²⁷⁾。

今回著者らが使用した細胞は 4 種類であり、Dir-Fetal-Liv および GM-Fetal-Liv の DST では Dir-Adult-Spl および GM-Adult-Spl の DST に比較して、著明な皮膚移植片の生着延長が認められた。次いで生着延長の原因細胞あるいは原因分子を探るため GM-CSF で培養した細胞 (GM-Fetal-Liv 細胞および GM-Adult-Spl) の細胞表面接着分子を比較した。その結果、GM-Adult-Spl では class I, class II, CTLA-4 ligand, THY1.2, MAC-1 が高発現していたが GM-Fetal-Liv では class II, THY 1.2 の発現がほとんど認められず、class I, CTLA-4 ligand の発現が GM-Adult-Spl と比較すると低いことが判明した。また、GM-Fetal-Liv は前述の Starzl ら²⁵⁻²⁷⁾の報告した未熟樹枝状細胞と同様に class II, CTLA-4 ligand の発現はほとんど認められなかったが、class I 分子の発現は

異なっていた。つまり、彼等の未熟樹枝状細胞は class I 発現していたが、著者らの得た GM-Fetal-Liv では低発現であり、GM-Fetal-Liv は彼等の得たようなほとんど均一な細胞ではなく樹枝状様細胞に好中球やマクロファージ様細胞が混在していた。以上の2点から Starzl らが成体肝細胞を GM-CSF で培養して得られた細胞と今回著者らが得た細胞は異なる細胞集団であることが考えられた。しかし、GM-Fetal-Liv の中にある未熟樹枝状細胞が存在するか否かは今後、解析の必要がある。

以上の細胞表面抗原解析と形態学的解析の結果より、GM-Fetal-Liv は GM-Adult-Spl と比してレシピエントの CD4⁺ および CD8⁺ T 細胞に認識、攻撃されにくく、免疫寛容を起ししやすい細胞である可能性が示唆された。

GM-Fetal-liv の DST と FK506 を併用した群で皮膚移植片の生着が延長したメカニズムとして以下の3点が考えられた。1) class I, II 抗原の発現が非常に少なくアロ反応性の T 細胞に認識されにくいこと、2) CTLA-4 ligand の発現が低く、レシピエントの T 細胞に認識された場合でも costimulatory 信号を導入する能力が低いのでレシピエントの T 細胞をアナジーの状態にすることができること、3) FK506 により T 細胞活性化反応を抑制することである。

Dir-Fetal-Liv と GM-Fetal-Liv を DST した際皮膚移植片の生着延長効果がほとんど同等であったことから、生着延長は GM-CSF 培養により増殖した細胞に関わりなく、両群に共通な胎児肝臓由来の細胞の作用である可能性と Dir-Fetal-Liv と GM-fetal-liv ではまったく異なった作用機序で生着延長が得られた可能性が考えられた。前者の場合、胎児肝臓由来の細胞とレシピエントの免疫担当細胞との直接的な接合が必要なのか、あるいは Lord ら²⁸⁾ が考察しているような液性因子が関与しているのか、より詳細に検討することが必要と考える。

5 要 約

著者らは拒絶反応が強く惹起される class I, II の異なるマウスの組み合わせ (BALB/c マウスから C3H/He マウスへ) で皮膚移植を施行した。その際、DST する細胞としては胎児の肝臓由来細胞あるいは成体の脾臓細胞をそのまま用いた場合と GM-CSF で培養したものを使用した。また、単独では治療効果のない、少量の FK506 を併用した。その結果、以下の4つの事実が明らかになった。

1. GM-CSF による培養の有無にかかわらず胎児肝臓由来の細胞はこれまで多くの研究者によって用いられてきた成体脾臓細胞と比較して FK506 との併用により著明にアロ皮膚移植の生着延長を惹起できた。

2. GM-CSF にて培養した胎児肝臓由来の細胞は GM-CSF にて培養した成体脾臓細胞に比較すると class I および class II の発現が非常に低い。

3. GM-CSF にて培養した胎児肝臓由来の細胞は CTLA-4 ligand の発現が非常に低い。

4. GM-CSF にて培養した成体脾臓細胞はマクロファージ様細胞と樹枝状様細胞が主体であったが、GM-CSF にて培養した胎児肝臓由来の細胞はマクロファージ系や樹枝状細胞系の細胞の中に分化の進んだ好中球が混在していた。

以上の結果より、レシピエントに FK506 を併用していることでより免疫寛容を引き起こしやすい状態であることに加えて、DST した GM-CSF で培養した胎児肝臓由来の細胞が class I および class II の発現が低値であるためにレシピエント CD4⁺, CD8⁺ T 細胞に認識、攻撃されにくいこと、あるいは、たとえ認識されたとしても CTLA-4 ligand の発現が非常に低いためにレシピエント T 細胞をアナジーに陥らせる可能性があることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご懇切なご指導、ご校閲をいただきました北海道大学免疫科学研究所免疫病態部門上出利光教授ならびに札幌医科大学医学部外科学第2講座小松作蔵教授はじめ教室の各位に深謝いたします。

文 献

1. Johnson CP, Munda R, Alexander JW, Balakrishnan K, Blanton M. The effect of donor-specific transfusions on rat heart allograft survival. *Transplantation* 1984, 38: 575-578.
2. Tanaka K, Sakagami K, Orita K. Effects of a single donor-specific blood transfusion on the survival of rat cardiac allografts. *Acta Med Okayama* 1988, 42: 31-36.
3. Iwaki Y, Terasaki PI. Donor-specific transfusion. In: Terasaki PI, editors. *Clinical Transplants 1986*. California, UCLA Tissue Typing Laboratory, 1986, 267-275.
4. Sonoda T, Ishibashi M. Donor-specific transfusion: a report of the Japanese Renal Transplant

- Registry. In: Terasaki PI, editors. Clinical Transplants 1987. California, UCLA Tissue Typing Laboratory, 1987, 257-260.
5. Billingham RE, Medawar PB. The technique of free skin grafting in mammals. *J Exp Med* 1951, 28: 385.
 6. 山田陽, 村上正晃. 可溶性 IgM 型 CTLA4 分子の作製. *札幌医誌* 1995, 63: 231-237.
 7. Schreiber SL, Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* 1992, 13: 136-142.
 8. Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 1992, 357: 695-697.
 9. Strom TB. Immunosuppressive agents in renal transplantation. *Kidney International* 1984, 26: 353-365.
 10. Thomson AW. FK-506 How much potential?. *Immunol Today* 1989, 10: 6-9.
 11. Opelz G, Sencar DPS, Mickey MR, Terasaki PI. Effect of transfusions on subsequent kidney transplants. *Transplant Proc* 1973, 5: 253-259.
 12. Iwata H, Kitagawa S, Sato S, Kosugi A, Hirose S, Hamaoka T, Shearer GM, Fujiwara H. Suppression of allograft responses by combining donor alloantigen-specific intravenous sensitization with suboptimal doses of FK506. *Transplantation* 1993, 56: 173-180.
 13. Harada M, Omoto K, Kimura G, Nomoto K. Priming with donor spleen cells and activated B cells can induce prolonged survival of class I-disparate skin allografts in cyclophosphamide-treated mice. *Transplantation* 1995, 60: 517-519.
 14. Gorczynski RM, Rossi-Bergman B, Sullivan B, Chen Z. Role of reactive nitrogen intermediates in the regulation of allogeneic skin graft survival in mice after portal vein pretransplant transfusion. *Transplantation* 1995, 60: 707-713.
 15. Lin H, Bolling SF, Linsley PS, Wei RQ, Gordon D, Thompson CB, Turka LA. Long-term acceptance of major histocompatibility complex mismatched cardiac allografts induced by CTLA4Ig plus donor-specific transfusion. *J Exp Med* 1993, 178: 1081-1086.
 16. Azuma T, Sato S, Kitagawa S, Hori S, Kokudo S, Hamaoka T, Fujiwara H. Tolerance induction of allo-class I H-2 antigen-reactive Lyt-2⁺ helper T cells and prolonged survival of the corresponding class I H-2-disparate skin graft. *J Immunol* 1989, 143: 1-8.
 17. Hori S, Sato S, Kitagawa S, Azuma T, Kokudo S, Hamaoka T, Fujiwara H. Tolerance induction of allo-class II H-2 antigen-reactive L3T4⁺ helper T cells and prolonged survival of the corresponding class II H-2-disparate skin graft. *J Immunol* 1989, 143: 1447-1452.
 18. Larsen CO, Morris PJ, Austyn JM. Migration of leukocytes from cardiac allografts into host spleens. *J Exp Med* 1990, 171: 307-314.
 19. Valdivia LA, Monden M, Gotoh M, Tono T, Nakano Y, Mori T. Suppressor cells induced by donor-specific transfusion and deoxyspergualin in rat cardiac xenografts. *Transplantation* 1991, 52: 594-599.
 20. Whelchel JD, Shaw JF, Curtis JJ, Luke RG, Diethelm AG. Effect of pretransplant stored donor-specific blood transfusions on early renal allograft survival in one-haplotype living related transplants. *Transplantation* 1982, 34: 326-329.
 21. 小松幹志. Donor Specific Transfusion により惹起された促進型拒絶反応に対する FK506 の効果—ラット異所性心移植モデルにおける検討—. *札幌医誌* 1990, 59: 323-333.
 22. Wakabayashi T, Degawa H, Sugimoto H, Imai T, Takeda Y, Tomikawa S, Yamauchi J, Ohtsubo O, Mori S, Akiyama N. A case of donor-specific transfusion (DST) rejection with morphological similarity to acute glomerulonephritis. *Jpn J Exp Med* 1986, 56: 89-92.
 23. Markees TG, Fazio SRD, Gozzo JJ. Tolerogenic behavior of skin allografts from neonatal mice. *Transplantation* 1994, 58: 1008-1014.
 24. Qian S, Demetris AJ, Murase N, Rao AS, Fung JJ, Starzl TE. Murine liver allograft transplantation: tolerance and donor cell chimerism. *Hepatology* 1994, 19: 916-924.
 25. Lu L, Woo J, Rao AS, Li Y, Watkins SC, Qian S, Starzl TE, Demetris AJ, Thomson AW. Propagation of dendritic cell progenitors from normal mouse liver using granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and their maturational development in the presence of type-1 collagen. *J Exp Med* 1994, 179: 1823-1834.
 26. Lu L, Rudert WA, Qian S, McCaslin D, Fu F, Rao AS, Trucco M, Fung JJ, Starzl TE, Thomson AW. Growth of donor-derived dendritic cells from the bone marrow of murine liver allograft recipients in response to granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1995, 182: 379-387.
 27. Thomson AW, Lu L, Subbotin VM, Li Y, Qian

- S, Rao AS, Fung JJ, Starzl TE. In vitro propagation and homing of liver-derived dendritic cell progenitors to lymphoid tissues of allogeneic recipients. Transplantation 1995, 59: 544-551.
28. Lord R, Kamada N, Kobayashi E, Goto S, Sunagawa M. Immunosuppressive 40-kd protein induced by orthotopic liver transplantation in rats. Transplant Proc 1995, 27: 399-401.
-

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学医学部外科学第2講座 馬場俊雄